

PCT

### E P



### 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条) [PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-483	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220 及び下記5を参照すること。	)
国際出願番号 PCT/JP00/01269	国際出願日 (日.月.年) 03.03.00 (日.月.年) 12.03.99	
出願人 (氏名又は名称) サントリー株式	式会社	
		$\neg$
国際調査機関が作成したこの国際調 この写しは国際事務局にも送付され		
この国際調査報告は、全部で3	· ·	
この調査報告に引用された先行	技術文献の写しも添付されている。	4
□この国際調査機関に提出る	くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。 なれた国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。	
b. この国際出願は、ヌクレオチ この国際出願に含まれる	ド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。 §面による配列表	
	されたフレキシブルディスクによる配列表	
□出願後に、この国際調査様	幾関に提出された書面による配列表	
□ 山野後に この国際調本は	*問に提出されたフレキシブルディスクによる配列表	
出願後に提出した書面に、	よる配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない自め原理	- 1
X 書面による配列表に記載 書の提出があった。	した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳遠	①
2. 請求の範囲の一部の調査	ができない(第I欄参照)。	
3.	いる(第Ⅱ欄参照)。	
4. 発明の名称は 🗓 出	I願人が提出したものを承認する。	
□ ĕ	に示すように国際調査機関が作成した。	
   5. 要約は X H	出願人が提出したものを承認する。	
	ŘⅢ欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定によ 国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内に D国際調査機関に意見を提出することができる。	り ここ
6. 要約書とともに公表される図4 第図とする。	は、 出願人が示したとおりである。	
1	出願人は図を示さなかった。	
	本図は発明の特徴を一層よく表している。	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	国際調査報告	国際出願者 PCT/JP00	0/01269
A. 発明の履	よする分野の分類(国際特許分類(IPC))	<del> </del>	·
Int.	Cl' C12N15/11, 5/14, A01H	15/00	
B. 調査を行	fった分野 b小限資料(国際特許分類(IPC))		
	. Cl' C12N15/00-15/90		
最小限資料以外	トの資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用	用した電子データベース (データベースの名称、誤	西査に使用した用語)	
G E I M E I	NBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ DLINE/BIOSIS/WPI (STN)	2	
	ると認められる文献	·	関連する
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するとき	さは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
P, X	Plant physiol., 120, June 1999 Takehito Inaba et al., "Identificate element involved in Phytochrome do of the pea small GTPase gen pra2",	wn-regulated expression	1-13
Y	Plant Cell Physiol., 39 (Supplement) Takehito Inaba et al., "Analysis of light-repressed expression of pra2	cis-elements needed for	1-13
X C欄の続	<u> </u> きにも文献が列挙されている。	□ パテントファミリーに関する5	別紙を参照。
* 引特も国以優日文にの際後先若献頭「L」「C」「C」「C」「C」「C」「C」「C」「C」「C」「C」「C」「C」「C」	のカテゴリー 連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す 願日前の出願または特許であるが、国際出願日 公表されたもの 主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 くは他の特別な理由を確立するために引用する (理由を付す) よる開示、使用、展示等に言及する文献 開日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表 て出願と矛盾するものではなく 論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、 の新規性又は進歩性がないと考 「Y」特に関連のある文献であって、 上の文献との、当業者にとって よって進歩性がないと考えられ 「&」同一パテントファミリー文献	、発明の原理又は埋) ) 当該文献のみで発明 ぎえられるもの 当該文献と他の1以 〔自明である組合せに
国際調査を気		国際調査報告の発送日 06.0	06.00

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

26.05.00

国際調査を完了した日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 THIS PAGE BLANK (USPTO)



関連すると認められる文献 C(続き). 関連する 引用文献の 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 請求の範囲の番号 カテゴリー\* 1-13 Plant Cell Physiol., 34(3), Apr. 1993 Y Yukio Nagano et al., "Isolation and characterization of cDNAs that encodes eleven small GTP-binding proteins from Pisum sativum", p. 447-455 The EMBO Journal, 16(10), May 1997 Y Gunther Neuhaus et al., "Phytochrome-regulated repression 1-13of gene expression requires calcium and cGMP", p. 2554-2564 The EMBO Journal, 10(10), Oct. 1991 Y Wesley B. Bruce et al., "A negatively acting DNA sequence 1-13element mediates phytochrome-directed repression of phyA gene transcription", p. 3015-3024 1 - 13Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(14), July 1993 Α Kazuichi Yoshida et al., "Phytochrome-regulated expression of the genes encoding the small GTP-binding proteins in peas", p. 6636-6640 1-13Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(14), July 1995 Α Yukio Nagano et al., "Location of light-repressible, small GTP-binding protein of the YPT/rab family in the growing zone of etiolated pea stems", p. 6314-6318 1-13Plant Physiol., 116, 1998 Α Sharlene C. Weatherwax et al., "The phytochrome response of the Lemma gibba NPR1 Gene is mediated primarily through changes in abscisic acid levels", p. 1299-1305

THIS PAGE BLANK MISPTON

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01269

A. CLASSI	A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/11, 5/14, A01H5/00					
	According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS	SEARCHED Control followed by	classification symbols)				
Minimum do Int.	Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  Int.Cl <sup>7</sup> Cl2N15/00-15/90					
Documentati	on searched other than minimum documentation to the ex	stent that such documents are included i	n the fields searched .			
GENB	ata base consulted during the international search (name of ANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ INE/BIOSIS/WPI(STN)	of data base and, where practicable, sear	ch terms used)			
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where appr	opriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
P,X	Plant physiol.,120,June 1999		1-13			
F,A	Takehito Inaba et al., "Identification of a cis-regulatory element involved in Phytochrome down-regulated expression of the pea small GTPase gen pra2",p.491-499		·			
Y	Plant Cell Physiol., 39(Suppleme Takehito Inaba et al., "Analysis for light-repressed expression of	of cis-elements needed	1-13			
Y	Plant Cell Physiol.,34(3),Apr.1993 Yukio Nagano et al., "Isolation and characterization of cDNAs that encodes eleven small GTP-binding proteins from Pisum sativum", p.447-455		1-13			
	i	7	1-13			
Y	The EMBO Journal, 16(10), May 1997 Gunther Neuhaus et al., "Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP", p.255-2564					
Y	The EMBO Journal, 10(10), Oct. 1991		1-13			
	Wesley B.Bruce et al., "A negativ					
Furthe	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	Sing data of			
* Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  "E" earlier document but published on or after the international filing date  "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"T" later document published after the int priority date and not in conflict with a understand the principle or theory understand the principle or theory understand to particular relevance; the considered novel or cannot be considered to expend the document is taken alor document of particular relevance; the considered to involve an inventive structure of the same patent document member of the same patent."	h the application but cited to underlying the invention he claimed invention cannot be sidered to involve an inventive lone the claimed invention cannot be step when the document is such documents, such rson skilled in the art			
than the priority date claimed						
Date of the 26	actual completion of the international search May, 2000 (26.05.00)	Date of mailing of the international set 06 June, 2000 (06.0	arch report 06.00)			
Name and	mailing address of the ISA/	Authorized officer				
Jap	anese Patent Office					
Facsimile No.		Telephone No.				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

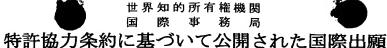
International application No.

PCT/JP00/01269

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
.ategory	element mediates phytochrome-directed repression of phyA gene transcription",p.3015-3024	
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90(14), July 1993 Kazuichi Yoshida et al., "Phytochrome-regulated expression of the genes encoding the small GTP-binding proteins in peas", p.6636-6640	1-13
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92(14), July 1995 YukioNaganoetal., "Location of light-repressible, small GTP-binding protein of the YPT/rab family in the growing zone of etiolated pea stems",p.6314-6318	1-13
А	Plant Physiol., 116, 1998 Sharlene C.Weatherwax et al., "The phytochrome response of the Lemma gibba NPR1 Gene is mediated primarily through changes in abscisic acid levels",p.1299-1305	1-13
		<u>*</u>
		•
	, ·	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

### **PCT**





(51) 国際特許分類7 C12N 15/11, 5/14, A01H 5/00

A1

(11) 国際公開番号

WO00/55313

(43) 国際公開日

2000年9月21日(21.09.00)

(21) 国際出願番号

PCT/JP00/01269

JP

(22) 国際出願日

2000年3月3日(03.03.00)

(81) 指定国 AU, CA, JP, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)

添付公開書類

国際調査報告書

(30) 優先権データ

特願平11/66551

1999年3月12日(12.03.99)

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP]

〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)

佐々木幸子(SASAKI, Yukiko)[JP/JP]

字464-0817 愛知県名古屋市千種区見附町1-14-A301 Aichi, (JP)

詠野幸生(NAGANO, Yukio)[JP/JP]

「〒465-0091 愛知県名古屋市名東区よもぎ台2-913-2F Aichi, (JP)

稻葉丈人(INABA, Takehito)[JP/JP]

〒466-0827 愛知県名古屋市昭和区川名山町1-92-201 Aichi, (JP)

**(74)** 代理人

社本一夫,外(SHAMOTO, Ichio et al.)

〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)

(54) Title:

PHOTOINHIBITORY PROMOTER

(54)発明の名称

光抑制性プロモーター

#### (57) Abstract

A DNA fragment or a promoter for expressing a target gene specifically under photoinhibitory or dark conditions. A photoinhibitory promoter is obtained from the 5'- upstream region of a plant gene expressed specifically under photoinhibitory or dark conditions and the function of this promoter is analyzed in detail to thereby clarify the cis element sequence and the core sequence participating in the photoinhibitory expression. An expression cassette having a DNA fragment containing these sequences in the upstream of a target gene is constructed and this expression cassette is transferred into a plant cell or a plant. Thus, a plant cell or a plant wherein the target gene is expressed specifically under photoinhibitory or dark conditions can be obtained.

本発明は、光抑制的に、ないしは暗所で特異的に、目的遺伝子を発現させるためのDNA断片もしくはプロモーターを提供する。

光抑制的ないしは暗所で特異的に発現している植物遺伝子の5'上流域から光抑制性プロモーターを取得し、該プロモーターの機能を詳細に解析して光抑制的発現に関わるシスエレメント配列およびコア配列を明らかにした。これらの配列を含むDNA断片を目的遺伝子の上流に設置した発現カセットを作製し、該発現カセットで植物細胞もしくは植物体に導入して、目的遺伝子が光抑制的にないしは暗所で特異的に発現する植物細胞もしくは植物体を得ることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報) アラブ首長国連邦 アンティグア・パーブーダ アルバニア KZ LC LI LK LR LS DM カザフスタン AG ドンスティンス アルストーン アルスペインラス フラブボーン ブラン DZ EE ES アルバニア アルメニア オーストリア オーストラリア アゼルバイジャン ボズニア・ヘルツェゴビナ スーケン スウェーデン シンガポール スロヴェニア スロヴァキア シェラ・ルオネ ŠĒ AM LUV MAC MC MD SL セネガル スワジラン チャード トーゴー STG JM TTT TTT ブルギナ・ファソ ブルガリア ベナン タジキスタン マルトリテ サグガスカル マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国 マリ ペテン ブラジル ベラルーシ カナダ 中央アフリカ コンフ イー/ ギリシャ ギニア・ビサオ クロアチア ハンガリー トルコ トルニダッド・トバゴ タンザニア ウクライナ ウガンダ HR ハイアイイアイ日ケキ北韓 ンンイスンイタ本ニル朝国 リネラエ ラア スリ アギ鮮 アドスリ アギ ド MN MR DELNSTPEGP スイス コートジボアール カメルーン 中国 MW MX MZ NE NL ソカンク サスズベキスタン ヴェトナム ユーゴースラヴィア 南アフリカ共和国 ジンパブエ VÑ YU コスタ・リカ コキューバスコー・ディンツー ニュー・ジーランドポーランド ボルトガルルーマニア

#### 明細書

### 光抑制性プロモーター

5

25

### 発明の分野

本発明は植物において、目的遺伝子の発現を暗所で活性化するため、または該目的遺伝子の発現を明所で抑制するためのプロモーターに関するものである。また、本発明は該光抑制性プロモーターを用いて、植物での遺伝子発現を明暗によって制御する方法に関するものである。より詳しくは、エンドウ由来の低分子量 Gタンパク質遺伝子の光抑制性プロモーター、および該プロモーターの利用方法に関するものである。

### 従来の技術

植物を含む真核生物の遺伝子発現制御機構は以下のように理解されている(経 塚、植物の形を決める分子機構、p107-117、秀潤社、1994年)。生物の各遺伝子 は、生物の生活史の様々な場面において、遺伝的に厳格に規定された発現パター ンをもつ。また、個々の遺伝子が正しい発現パターンを示すおかげで、生物は個 体としての機能を維持できている。組織特異的発現(空間的時間的に制御された 発現)は、遺伝子発現の重要な制御の一つである。特に個体の発生、形態形成、 20 成長においては、定められた遺伝子(群)の組織特異的発現が、パターンの維持 とさらにひき続く過程を遂行するための基礎的な情報となっていく。

遺伝子発現制御には、転写レベルとそれ以降の段階で起こるものの両方があるが、前者が一般的であり、研究も進んでいる。転写レベルでの発現制御では、遺伝子の発現パターンを決定する情報のほとんどは、転写される領域の5'側にあるプロモーター領域にあるとされている。プロモーターは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域である。この領域にRNAポリメラーゼあるいは転写因子が結合することによりプロモーターとして機能する。タンパク質をコードする遺伝子はすべてII型のRNAポリメラーゼによって転写される。

プロモーター中にはさまざまなシスエレメントがあることが多い。シスエレメントは、転写領域を含むDNA分子と同一分子上にある遺伝子の転写活性に影響を与える領域である。多くの遺伝子のプロモーターにおいて、(1)ポジティブ/ネガティブに働くシスエレメントが存在する、(2)ある特定の組織(例えば、種子、葉、花粉など)での特異的転写に対しても、複数の組織特異的シスエレメントをもつ場合が多く、それらが独立にあるいは相互に関係しながら転写パターンおよび転写量を決定している、(3)それぞれの遺伝子のプロモーター上には複数のシスエレメントがモジュラーとして存在し、それらの機能の最終的な総和として、その遺伝子に固有の組織特異的転写パターンが決定されている、などのことがわかってきている。

5

10

15

20

25

植物において遺伝子組換え技術が確立して以来、多くの形質転換植物が商業化されている。これらの形質転換植物に導入した外来遺伝子の発現を制御するプロモーターには、一般にカリフラワーモザイクウィルス35 S プロモーター、ノパリンシンターゼプロモーターなどの構成的に発現するプロモーターが用いられてきた。しかし、外来遺伝子を構成的に発現させることは、形質転換植物自体への悪影響、いわゆるペナルティーを惹起することが懸念される。上記のように植物を含む真核生物の遺伝子発現は組織、時期、外部環境などによって制御されているが、このような遺伝子の転写制御部位(プロモーター)を有用な外来遺伝子の上流に挿入して発現カセットを作製し、この発現カセットを植物に導入すれば、外来遺伝子を適切な組織、時期、環境において発現させることができる。このことを実現するためには、目的の遺伝子を適切な組織、時期、環境において発現させるプロモーターが必要となる。外来遺伝子を組織特異的に発現させることは産業上有用である。たとえば、植物体の食用部分で外来遺伝子を発現しないように制御できれば、安全性へのリスクを低減でき、パブリッアクセプタンスを得やすくなる。

光による遺伝子の発現制御は植物の形態形成および成長にとってきわめて重要であり、光によって転写が活性化される、あるいは光によって転写が抑制される遺伝子がある。このような光制御性遺伝子のプロモーター領域を取得し、このプロモーターを外来遺伝子の上流に連結して光制御性発現カセットを作製し、この

光制御性発現カセットを植物に導入すれば、その植物体において外来遺伝子の発現を光によって制御することができる。このように光によって外来遺伝子の発現を制御することにより、構成的に発現させることによって生じる形質転換植物自体への悪影響を回避することができる。

植物は発芽すると地中で急激に茎が伸び、地表に出て光があたるとその伸長が止まって、葉を展開させて光合成を開始する。これらの変化の多くは光受容体を介した遺伝子発現調節により制御されている。エンドウ由来の低分子量 G タンパク質遺伝子pra2 (Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455) は光受容体のフィトクロムによって制御されている (Yoshida et al. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6636-6640)。pra2遺伝子はエンドウ上胚軸伸長部位に発現しており、光によりその発現が抑制されることから、暗発芽時の茎の伸長に関与していると考えられている。

15

20

25

これまでに光によりその発現が活性化される、すなわちフィトクロムにより正の制御を受ける数多くの遺伝子が報告されている。例えば、エンドウ由来のリブロース1,5-2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットrbcS(Sasaki et al. 1983 Eur. J. Biochem. 133:617-620)、アオユキクサ由来の集光性クロロフィルタンパク質Lhcb(Kehoe et al., 1994 Plant Cell 6:1123-1134)などがある。それらのいくつかについては、転写制御に関わるトランスファクターとなる転写因子が詳細に解析されてきた(Terzaghi and Cashmore, 1995, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46, 445-474)。さらに、これらのシスエレメントを含むプロモーターを利用して、植物体において外来遺伝子の発現を光によって正に制御すること、すなわち光によって転写・発現を活性化することも行われている。例えば、上記rbcSの3Aプロモーターの下流にサイトカイニン合成遺伝子iptをつなぎ、タバコに導入したところ、サイトカイニンの合成が光誘導的に起こった(Thomas J. C. et al. 1995 Plant. Mol. Biol. 27: 225-235)という報告がある。

しかし、フィトクロムにより負の制御を受ける遺伝子、すなわち、フィトクロムによって転写・発現が抑制される遺伝子の報告は少なく、その制御に関わるシスエレメントの報告はほとんどない。フィトクロムA遺伝子、phyAのプロモータ

ーはよく解析されおり、フィトクロムにより抑制されるシスエレメントであるRE 1配列が同定されてはいるが(Bruce et al. 1991, EMBO J. 10:3015-3024)、そこに結合する転写因子までは同定されていない。大豆の $\beta$ チューブリン遺伝子であるtubB1(Tonoike et al. 1994, Plant J. 5:343-351)、アスパラギンシンターゼであるAS1(Nagai et al, 1997, Plant J. 12:1021-1034)、アラビドプシスのホメオボックス遺伝子の一つであるtubB1(Carabelli et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:tubB10 も光で抑制される遺伝子であることがわかってはいるが、一部を除きそのプロモーターの詳細な解析はされていない。

10

5

#### 発明の概要

本発明は、明所で遺伝子の発現を抑制するが、暗所で遺伝子の発現を活性化するプロモーターおよび、明所でプロモーターによる遺伝子の発現を抑制するが、暗所でプロモーターによる遺伝子の発現を活性化するのに必要なシスエレメント配列を提供する。

15 本発明はまた、該プロモーターおよび/またはシスエレメントによって、光によって外来遺伝子の発現を抑制する、ないしは暗所で外来遺伝子の発現を活性化する方法を提供する。

また、本発明は該光抑制性プロモーターおよび/またはシスエレメントを用いて、暗所で目的遺伝子を特異的に発現するための発現カセット、該発現カセットを組み込んだ植物を製造するための発現ベクター、および該発現ベクターで植物を形質転換して、好ましくはそのゲノム中に目的遺伝子を導入することによって、該目的遺伝子が暗所で特異的に発現するように制御された形質転換植物も提供する。

25

20

#### 図面の簡単な説明

図1は、pra2染色体遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を示す図で、塩基配列番号は転写開始点(↓で示す)を0として右側に、アミノ酸配列番号は左側に示した。矢頭はエキソンとイントロンの境界を示し、113塩基対の逆方向相同配列は下線で示し、対向する矢印で逆方向反復配列を示した。93塩基対のシスエレ

メントおよびTATA BOXはボックスで囲み、12塩基対のコア配列は網掛けにした。

図2は、pra2プロモーターによるレポーター遺伝子の発現が光によって抑制されることを示す図で、Dは暗条件下に、Lは光条件下に12時間置いた後のレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)の発現量を示す。a)の左側は黄化茎の成長部分に、右側は成長部分の切片に金粒子を打ち込んだ場合を示し、b)は、黄化茎の各部位でのレポーター遺伝子の発現量を示す。

5

10

25

図3はpra2プロモーター欠失変異解析の結果を示す図で、a)はpra2プロモーターの欠失クローンの構成を示しており、図中、5'UTRはpra2遺伝子mRNAの5'上流域を、LUCはルシフェラーゼ遺伝子を、NOSはノパリンシンターゼ遺伝子のターミネーターを示す。b)は、a)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下に、Lは光条件下に置いた場合を表す、c)は、b)でのレポーター遺伝子の発現を暗条件下と光条件下の比で表したものである。

15 図4はカリフラワーモザイクウィルス由来35Sプロモーターと組み合わせた場合のプロモーター活性を示す図であり、a)は、pra2プロモーターの欠失クローンの構成を示す図で、93bpのシスエレメントは白棒で、それ以外のプロモーター部位は黒棒で表す。35S90はカリフラワーモザイクウィルス由来35Sプロモーターを、LUCはルシフェラーゼ遺伝子を、NOSはノパリンシンターゼ遺伝子のターミネクターを示す。b)はa)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下に、Lは光条件下に置いた場合を表す。

図5は光抑制性シスエレメントを解析した結果を示す図であり、a)はpra2プロモーターの欠失クローンの構成を示す図で、93bp塩基対のシスエレメントは白棒で、それ以外のプロモーター部位は黒棒で表す。5'UTRはpra2遺伝子mRNAの5'上流域を、LUCはルシフェラーゼ遺伝子を、NOSはノパリンシンターゼ遺伝子のターミネーターを示す。b)はa)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下を、Rは赤色光を2分間照射した後暗条件下に置いた場合を、R/Fは赤色光を5分間照射し

その後2分間近赤外光を照射した後暗条件下に置いた場合を示す。

5

10

15

20

25

図 6 はコア配列のリンカースキャニング解析の結果を示す図であり、a)は、図 5 に記載したPL4Aの構成のなかで、コア配列近傍の野生型および変異型の塩基配列を示し、小文字の部分は野生型から変異した塩基を示す。b)はa)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下に、Rは赤色光を2分間照射した後12時間暗条件下に置いた場合を示す。

図7はゲルシフトアッセイの結果を示す図で、a)は実験に用いた合成DNAの配列を示し、WTは野生型の、MTは変異型の配列を表す、b)はゲルシフトアッセイの結果を示す図で、図中、Dは暗所で生育させた、Lは6時間光照射したエンドウ上胚軸から調製した各抽出液を添加したことを示す。矢印は合成DNAとタンパク質の複合体の電気泳動位置を示す。

図8は12-bp シスエレメントの光応答性を示す図で、a)は12-bp シスエレメントを9 回繰り返して最小プロモーター(CaMV 35S46)の上流に連結したpGF9の構成、および変異12-bp シスエレメントを9 回繰り返して最小プロモーターの上流に連結したpGF9M の構成を示す、b)はpGF9またはpGF9M をエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、D は暗条件下を、 Rは赤色光を2 分間照射した後暗条件下に置いた場合を、R/F は2 分間の赤色光照射後しその後5 分間近赤外光を照射した後暗条件下に置いた場合を、F は5 分間の近赤外光を照射した後暗条件下に置いた場合を示す。

#### 発明の詳細な説明

本発明者らは暗所で特異的に発現する植物由来の遺伝子を鋭意研究した結果、エンドウ由来の低分子量Gタンパク質遺伝子pra2の5'上流域に、暗所でpra2遺伝子の発現を活性化する機能、すなわち光抑制性プロモーター機能があることを見いだした。該光抑制性プロモーターを詳細に解析した結果、該プロモーター中の93 bpの塩基配列が光抑制性のシスエレメントであることがわかり、該シスエレメント中に存在する12 bpのコア配列が光抑制的発現に必須の配列であることを見いだした。さらに、これらのコア配列あるいはシスエレメントを含むプロモー

ター (該光抑制性プロモーターであっても、別の構成的プロモーターとの組み合わせであってもよい)を目的遺伝子の上流に挿入することによって、該目的遺伝子の発現が暗所で活性化され、明所で抑制されることを確認した。さらに、12塩基対のコア配列からなる12-bp シスエレメント自身が、下流に設置した遺伝子の発現に光抑制性を付与する事を確認して、本発明を完成した。

5

10

15

20

25

従って本発明は、明時に遺伝子の発現を抑制し、暗時に遺伝子の発現を活性化する ・ 大抑制性プロモーターおよび/またはシスエレメント配列を提供する。

より具体的には、本発明は、配列番号1または2の塩基配列をシスエレメントとして有し、下流に設置した遺伝子の発現が光によって抑制されること、または暗所で該遺伝子の発現が活性化することを特徴とするプロモーター、および/またはシスエレメント配列、および該プロモーターまたはシスエレメント機能を有するDNA断片を提供する。本明細書により開示する配列番号1に記載の12塩基対の配列、該12塩基対の配列を含む配列番号2に記載の93塩基対の配列、および該93塩基対の配列中で上記12塩基対の配列以外の部分で1個若しくは複数個の塩基の欠失、置換及び/又は付加により修飾された配列は、光によって発現が抑制されるために必要なシスエレメントないしはシス因子である。従って、請求項1から請求項6までに記載のDNA断片ないしはプロモーターを含有するものは、すべて本発明の範囲に含まれる。また、12塩基対のコア配列からなる12-bpシスエレメントだけで、下流に設置した遺伝子の発現に光抑制性を付与するのに十分である。なお、ここで光とは可視光及び近赤外光のことをいい、赤外線や紫外線は含まない。

本発明の光抑制性プロモーターは、その下流に設置される種々の遺伝子の発現を、光の有無に基づいて制御できる。しかし、必要であれば、本発明の光抑制性プロモーターは、光による発現の制御を必要とする遺伝子に本来付随するプロモーター、あるいは他起源のプロモーターと一緒に用いてもよい。そのようなプロモーターとしては、構成的発現プロモーターが好ましい。なお、ここでいう構成的発現とは、例えば光の有無など、環境条件にかかわらず、常に発現しているという意味である。従って、本発明はまた、上記の光抑制性プロモーターまたはそのシスエレメントと、構成的発現プロモーターを組み合わせて、目的遺伝子の発

現を光抑制的に制御するプロモーターも提供する。構成的発現プロモーターとしては、種々のものが本発明の目的に利用できる。例えば、植物細胞中で遺伝子を発現させるために使用されるプロモーターとして、例えば、カリフラワーモザイクウィルス35Sプロモーターやノパリンシンターゼプロモーターなどがある。しかしながら、構成的発現プロモーターは、必ずしもこれらに限定されない。植物細胞以外の宿主、例えば、緑藻類などのフィトクロムを有する宿主で遺伝子を発現させるための構成的発現プロモーターも、上記の光抑制性プロモーターまたはそのシスエレメントと組み合わせて使用することにより、宿主による遺伝子産物の生産を光によって制御することが可能である。また、構成的発現プロモーターの一部、例えばカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの一部、すなわちー72領域までの最小プロモーター(CaMV 35S46)もこの目的に用いることができる。

5

10

15

20

25

本発明は、上記の光抑制性プロモーターまたはシスエレメントの下流に目的遺伝子を設置し、該目的遺伝子を光抑制的に、ないしは暗所で誘導的に発現させる、光抑制的発現カセットも提供する。このようなカセットは、さらに、リボソーム結合部位、エンハンサー、ターミネーター等の目的遺伝子の発現のために有用な他の配列を含んでもよく、さらには、目的遺伝子に本来伴うプロモーター、あるいは外来のプロモーターを、上記光抑制性プロモーターまたはシスエレメントの下流に含んでもよい。また、12塩基対のコア配列からなる12-bp シスエレメントだけで、下流に設置した遺伝子の発現に光抑制性を付与するのに十分であることも見出した(実施例9参照)。発現カセットは、適当な発現ベクターに組み込んで、細胞の形質転換に使用することができる。発現カセットまたは発現ベクターは、目的遺伝子で形質転換された細胞の選択を容易にするための選択マーカー、例えば抗生物質耐性遺伝子を含んでいてもよい。形質転換に特に適する細胞は、植物細胞である。

本発明はさらに、上記の光抑制的発現カセットで形質転換した植物細胞、該形質転換細胞を培養して再生させた組換え植物も提供する。発現カセットで植物細胞を形質転換し、目的遺伝子を植物細胞の染色体に安定に組み込む方法は、パーティクルガン法、アグロバクテリウム法等がよく知られている。形質転換した植

物細胞を、植物用の培地でカルスに育て、さらにカルスから完全な植物体に増殖させる方法は、よく知られている。形質転換および植物体への再生が可能な植物として、例えばバラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、ダイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワーなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。また、得られた植物体から交配によって安定な形質転換体を品種として固定させる方法もよく知られている

10

15

20

5

本発明の発現カセットを用いて、農作物を形質転換すれば、例えば、暗所保存中に農作物の品質向上や劣化防止を達成することができる。例えば、

- 1. エチレンあるいはその前駆体を分解する酵素をコードしている遺伝子を本発明のシスエレメントまたはプロモーターに結合し、発現カセットとして植物工場で生産する野菜に導入することにより、収穫後暗所に貯蔵した状態のときのみエチレンの生産を抑制して、野菜の過剰な成長や成熟が防止できる。
- 2. 特定のタンパク質アレルゲンを分解するプロテアーゼを稲や麦等の作物で発現させ作物中のアレルゲンを除去することができる。
- 3. チオレドキシンを発現させ、作物中の蛋白質のS-S結合を組換えてアレルゲン性を除去することができる。
  - 4. セルラーゼ遺伝子を発現させ、作物の栄養価を高め、消化の良い食品素材を提供することができる。
  - 5. アミラーゼ遺伝子を野菜や果樹で発現させ、野菜、果実の澱粉を分解させて 甘みを付与することができる。
- 25 6. ミトコンドリアでの呼吸を抑制し、野菜などの品質劣化を防ぐことができる
  - 7. 殺虫活性蛋白を農作物中で発現させ、収穫後の作物を虫害から守るなどが考えられる。
  - 8. ルシフェラーゼ遺伝子を用いて暗闇で光る植物を作製することができる。

9. 夜間に芳香がする植物を作ることができる。

などの用途もあるが、これらに限定されるものではない。

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

5

20

25

光によって遺伝子の発現が抑制される、あるいは暗所で遺伝子の発現が活性化するという現象は、その遺伝子の上流領域にあるプロモーターによって制御されている。本発明者らは、光でその発現が抑制される遺伝子の上流領域を取得し、この上流領域の機能を詳細に解析して光抑制性の遺伝子発現に関わるシスエレメントの配列を同定すれば、本発明の課題である光抑制性プロモーターを得ることができると考えた。

10 そこで、エンドウ由来低分子量Gタンパク質遺伝子pra2のcDNA遺伝子をプローブとしてエンドウの染色体遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより、pra2の染色体遺伝子を取得した(実施例1参照)。このpra2染色体遺伝子には、2325塩基対からなる5'上流域が存在することがわかった。さらに、プライマーエクステンション法によって転写開始点を解析した結果、pra2 mRNAには196塩基対の5'上流域が存在し、このpra2染色体遺伝子には2129塩基対の転写制御領域(プロモーター領域)が存在することが分かった(実施例1、図1参照)

発明者らは、この2325塩基対の5'上流域の下流にレポーター遺伝子を接続したDNA断片を、パーティクルガンでエンドウ植物体に導入しレポーター遺伝子の発現を解析することにより、この5'上流域が光抑制的に遺伝子発現を制御していること、すなわち光抑制性プロモーター機能があることを見いだした(実施例2参照)。次に、この5'上流域の各種欠失クローンを作製して、上記の方法で植物体での光抑制的発現を解析することにより、配列番号2に記載の93塩基対の配列が光抑制的発現に関わるシスエレメントであることを見いだした(実施例3、4参照)。発明者らはまた、該シスエレメントを他のプロモーターと組み合わせたプロモーターも光抑制的に遺伝子の発現を制御することも見いだした(実施例5、6参照)。発明者はさらにリンカースキャン法およびゲルシフト法により、該シスエレメント中に存在する配列番号1に記載の12塩基対からなるコア配列が、光抑制的発現に必須の領域であること、および12-bpシスエレメントだけで、下流に設置した遺伝子の発現に光抑制性を付与するのに十分であることを見いだした

WO 00/55313 (実施例7、 8 参照)。

#### 実施例

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法は特に断らない 限り、Molecular Cloninng (Sambrook et al., 1989) に依った。

### 実施例 1. pra2染色体遺伝子の単離と転写開始点の決定

pra2 cDNA (Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455) をプローブとして用い、エンドウ染色体遺伝子ライブラリー(ストラタジーン社)をNaga noらの方法 (Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455) でプラークハイブリダイゼーションを行うことにより、pra2染色体遺伝子クローンを単離した。pra2染色体遺伝子の塩基配列を図1に示した。染色体遺伝子には2つのエクソンと1つのイントロンがあった。染色体遺伝子から推定されるアミノ酸配列はcDNAから推定されるアミノ酸配列(Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455)と一箇所で異なっていた。すなわちcDNAでは206番目がグリシンであったが、染色体遺伝子ではアラニンであった。これは、染色体遺伝子とcDNA遺伝子の単離に用いたエンドウの品種が異なるためと考えられる。

次に、プライマー・エクステンション法 (Nagano et al. 1991 Curr. Genet. 20: 431-436) により転写開始点を決定した。プライマーとしては塩基配列 5'-ACGGTTGTTGAATTACCGGTGTTAATAGAG-3'

20 を持つプライマーを化学合成した。<sup>82</sup>P-ATPで標識した合成プライマーと1.1 μ gのpolyA<sup>+</sup> RNAとをハイブリダイズし、スーパースクリプトII (Gibco BRL 社)を用いた逆転写を行った。生成物を電気泳動してその塩基配列を解析した結果、染色体遺伝子は196bpの5'上流域を持つことが明らかになった(図1)。推定されるTATA boxは翻訳開始点より上流24bpに位置することが示された。

25

5

10

15

## 実施例2. トランジェント・アッセイ系の確立

エンドウ (Pisum sativum cv. Alaska、雪印種苗社)を直径 14 mmのポット中、暗所で播種し、暗所で5-6日間栽培した。この植物体をパーティクルガン (bombardment装置、Model GIE-III,田中社) 中に水平に置いた。この装置につ

5

10

15

20

25

打ち込み後、植物体を25℃、12時間の暗条件あるいは明条件(70 $\mu$ mole/m²/se cの白色光)下に置いた。遺伝子導入した茎を液体窒素中で細かく砕き、粉末を3 00 $\mu$ 1 の100 mMリン酸カリウム(pH7.8)、1 mMヂチオスレオトール、1%トライトンX-100、1 mM EDTAに懸濁した。15,000 x gで4℃、5 分間遠心した後、上清を-80℃で凍結し、ルシフェラーゼ活性を測定するまで保存した。ルシフェラーゼ活性測定は、Millerらの方法(Miller et al. 1992、Plant Mol. Biol. Reptr. 10:324-337)に基づいたピカジーンルシフェラーゼ測定キット(和光純薬社)を用いて行なった。ルシフェラーゼによる発光の測定には、AUTO LUMAT(Bert hold社)を用いた。GUS活性は、4-methyl umbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide(和光)を基質として用いる方法(Jefferson et al. 1987、EMBO J. 6: 3901-3907)により行ない、生じた4-methyl-umbelliferone濃度の測定にはFluoroskan I I (Labosystems社)を用いた。ルシフェラーゼ活性は、内部標準として導入したGUS活性に基づき校正した。

レポーターであるルシフェラーゼの植物体中での活性を調べた結果、ポットで 生育させたエンドウでは光の有無によっての活性に明らかに差があることが示さ れた(図2a)。すなわち、ルシフェラーゼは、遺伝子導入後暗所で栽培した植物 体で、明所で栽培した植物体よりも約3倍程度強く発現していた。さらに、茎の 異なった部位に同じプラスミドを導入したところ、茎伸長部位で最もルシフェラ ーゼ活性が高いことが明らかになった(図2b)。以上の結果から、pra2遺伝子の

5'上流領域は明条件下でレポーター遺伝子の発現を抑制すること、すなわち茎伸長部位特異的な発現を抑制することが示された。

### 実施例 3. 5'上流領域欠失クローンの作製

10

15

20

25

5 pra2遺伝子5'上流領域(2129 bp)の光抑制に関わるシス領域を決定するため、 さまざまな欠失クローンを以下の方法で作製した。

(方法1) pra2遺伝子の上流領域を、5'端にHindIII認識配列を含む一連の上流 領域プライマーとpra2遺伝子の開始コドンATGに対応したNcoI認識配列を含むプ ライマー (NcoIプライマー:5'-GGTCCATGGTCTTGTCAAGATC-3') を用いて増幅した 。リンカースキャニング欠失クローンは、上流領域プライマーの内部にPstI認識 配列に相当する6塩基の変異を導入したプライマーを用いた(LSコンストラクト )。増幅した断片は、pZErO-2.1 (Invitrogen) のEcoRV部位にサブクローニング し、HindIIIとNcoIで消化した。HindIII-NcoI断片を電気泳動で分離し、DNA抽出 キット (ファルアシア) により目的のDNA断片を回収した。ルシフェラーゼ遺伝 子を含むプラスミドpBI221-LUC (植物の細胞を観る実験プロトコール、p199-20 0、秀潤社に記載)をHindIIIとNcoIで消化したDNA断片と、回収したDNA断片のそ れぞれを結合した。サブクローニングしたDNA断片はその塩基配列を決定し、pra 2遺伝子5'上流領域の該当部分の配列と一致すること確認した。上記の方法1に よって、PL1 (5'-GGGAAGCTTTAAAGGCAAGGG-3'とNcoIプライマーで増幅)、PL3 (5 '-ACGTAAAGCTTAAAAATTCACCC-3'とNcoIプライマーで増幅)、PL4(5'-AAATAAAGCT TAAAAGTAACACATA-3'とNcoIプライマーで増幅)、PL4B(5'-AAATAAAGCTTAAAAGTAA CACATA-3'と5'-GTACTGCAGTCAGACATGATTAACAAG-3'で増幅)、PL5(5'-AAAGAAGCTT GGTAGCCCAAACAA-3'とNcoIプライマーで増幅)、LS 1 (5'-AAGCTTctgcagGGATTTTAC AGTAATAAA-3'とNcoIプライマーで増幅)、LS2(5'-AAGCTTGTCTGActgcagTACAGTAA TAAAGAAAC-3'とNcoIプライマーで増幅)、LS3(5'-AAGCTTGTCTGAGGATTTctgcagA ATAAAGAAACGAGGTAG-3'とNcoIプライマーで増幅)、LS4(5'- AAGCTTGTCTGAGGATT TTACAGTctgcagGAAACGAGGTAGCCCAAA-3'とNcoIプライマーで増幅)、LS5(5'-AAGC TTGTCTGAGGATTTTACAGTAATAAActgcagAGGTAGCCCAAACAAG-3'とNcoIプライマーで増 幅)を作製した。

(方法 2) PL1を鋳型としてLA-Taqポリメラーゼ(宝)を用いるinverse PCR法により、PL2(5'-TCAATGGGACACGCTGCCTGACCACCATGT-3'とpUC19プライマー:5'-GGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG-3'で増幅)、PL6(5'-TGTCGGTGCAAAAAATGAAACCCCCAAACTT-3'とpUC19プライマーで増幅)、PL7(5'-AATGTTTATCCCTTGCACACATTTCACTC-3'とpUC19プライマーで増幅)、PL8(5'-GCAAAACATCACAACCTCTAGAAAC-3'とpUC19プライマーで増幅)、PL4C(5'-GTTTGGCTGCAGTCGTTTCTTTATTACTGTAAAATCCTC-3'と5'-CAATACTGCAGTATATGTTATGATATATATGATGCAGC-3'で増幅)を作製した。増幅した断片を平滑末端化し、セルフライゲーションした。

5

10

15

20

25

(方法3) Pra2-35S90LUC (GF) プラスミドを構築するためには、pra2上流領域を各々EcoRV認識配列とPstI認識配列を含む2つのプライマーでPfu DNA Polymeraseを用いて増幅した。増幅されたDNA断片をpZErO-2.1 (Invitrogen) のEcoRV部位にサブクローニングし、EcoRVとPstIで消化した。回収したEcoRV-PstI断片をpBI221-LUC+のEcoR-PstIサイトにサブクローニングした。5種類の長さの異なるDNA断片を増幅した。すなわち、GF1 (GFプライマー:5'-TACTGCAGAAAAGTAAC ACATATTT-3'と5'-TGGTGATATTGTTTAGATATCATATTATTGC-3'で増幅)、GF2 (GFプライマと5'-ATGATATCCAAGGGATTTGGAAAT-3'で増幅)、GF3 (GFプライマーと5'-GTGATAT CGGGATAAACATTTTAAGG-3'で増幅)、GF4 (GFプライマーと5'-TTGATATCCCGACAAAGA TCACAC-3'で増幅)、GF5 (GFプライマーと5'-GGGATATCTCGTTTCTTTATTACT-3'で増幅)を作製した。

(方法 4) PL4Bを作製するために、各々HindIII認識配列とPstI認識配列を5'側に持つ2種のプライマーとPfu DNA Polymeraseを用いて、pra2上流領域を増幅した。増幅されたDNA断片をHindIIIとPstIで消化後、pZErO-2.1のHindIII-PstI部位にサブクローニングし、配列を確認後、またHindIIIとPstIで消化した。この断片をLUC遺伝子をもつLS5のHindIIIーPstIサイトにサブクローニングした。

実施例 4. 欠失クローンのプロモーター活性解析

実施例 3 に記載の(方法 1)および(方法 2)で、Pra 2 遺伝子の5'上流領域を5 '側から順次欠失させたPL1からPL8までの 8 種の欠失クローンを作製した(図 3a)。これらの欠失クローンを実施例 2 で述べた方法によりエンドウ茎伸長部位

にパーティクルガンで導入し、暗条件、明条件で茎伸張部位のルシフェラーゼ活性を測定した。PL1からPL4の4つの欠失クローンでは暗所におけるルシフェラーゼの発現レベルが同程度であり、光によるルシフェラーゼ活性の抑制も観察された(図3b)。しかしPL5からPL8では暗所での発現レベルが大幅に低下し、光による発現抑制も見られなくなった(図3b)。この結果はPL4からPL5の間にある93塩基対の領域に光応答に関わるシスエレメントが存在することを示している。各欠失クローンにおける暗条件と明条件でのルシフェラーゼ活性の比(D/L比)も、PL4とPL5で劇的に変化しており(図3c)、93-bp領域に光応答領域が存在すること、すなわち該93塩基対からなる配列番号 2 に記載した配列を有するDNA断片が、光によって発現が抑制される機能に関わるシスエレメントであることを示している。PL7におけるルシフェラーゼ発現レベルの回復は、-593から-292の間に発現レベルを抑制するリプレッサーが、-291から-101の間に発現レベルを上昇させるエンハンサーが存在することを示唆している。

# 15 実施例 5. 他のプロモーターとの組み合わせ効果

20

25

この93塩基対の光抑制性シスエレメントが、他のプロモーターに光応答性を付与できるか、すなわち光抑制性シスエレメントと他のプロモーターを組み合わせた場合に、該プロモーターが光抑制性プロモーターとしての機能を発揮するかどうかを調べた。異なった長さに3'側を欠失したpra2遺伝子の5'上流領域を、カリフラワーモザイクウィルス35S(CaMV 35S90)プロモーターに融合し、5種類のクローンを実施例3の(方法3)に記載した方法で作製した(図4a)。-24から+196まで欠失したGF1では光応答性が確認されなかったが、-101から+196まで欠失したGF2では光応答性が見られた(図4b)。これは-101から-25の領域に存在するシスエレメントとCaMV 35S90プロモーター中のas-1エレメントとの相互作用の結果だと考えられる。その他のGF3、GF4および93-bp光抑制性シスエレメントのみのGF5では、全てにおいて光応答性が認められた(図4b)。これらの結果は、93塩基対の光抑制性シスエレメントが、異種プロモーターであるCaMV 35S90プロモーターに光抑制性を付与するのに十分であることを示している。

### 実施例 6. フィトクロム応答エレメントの解析

5

10

15

20

25

pra2遺伝子の発現は光受容体であるフィトクロムにより制御されている。そこ で、93-bp光抑制性シスエレメント中にフィトクロム応答性シスエレメントがあ るか調べた。まず、93-bp光抑制性シスエレメントを含むPL4と含まないPL5につ いて調べた(図5a)。暗条件下のサンプルは遺伝子導入後12時間、暗条件下に置 いた。赤色光処理のサンプルは遺伝子導入後2分間赤色光処理し、その後12時間 暗条件下に置いた。赤色光/近赤外光処理のサンプルは2分間の赤色光処理後5分 間の近赤外光処理をし、その後12時間暗条件下に置いた。その結果、PL4では赤 色光によるルシフェラーゼの発現抑制と近赤外光による回復が認められたが、PL 5では赤色光による発現抑制が全く見られなかった(図5b)。93-bp光抑制性シス エレメントだけでpra2プロモーターにフィトクロム応答性を付与できるか調べる ため、該シスエレメントをpra2遺伝子上流領域のTATAbox及び5'上流域に融合し たクローンを作製した(図5a中のPL4C)。その結果、発現レベルは大幅に下がっ たが、該シスエレメントだけでフィトクロム応答性を付与できることが示された (図5b)。さらに詳細に解析するため、PL4とPL5の間に欠失を持つPL4Aを作製し た(図5a)。その結果PL4に比べ発現レベルは下がったものの、フィトクロム応 答性は維持されていた(図5b)。さらに、31-bp 領域(-672から-642)中の24塩 基対を内部欠失したコンストラクト (PL4B) を作製し、検討したところ、フィト クロム応答性が見られなくなった(図5a及び5b)。これらの結果は-672から-642 の31塩基対の領域にフィトクロム応答性シスエレメントが存在することを示して いる。同時に、-734から-673の62塩基対の領域に発現レベルに影響するシスエレ メントが存在することも示唆された。

# 実施例7. リンカー・スキャン法による12-bp コア配列の決定

赤色光によるレポーター遺伝子の発現抑制に関わるシスエレメント中のコア配列を決定するため、上記31-bp 領域をリンカー・スキャン法により調べた。異なった位置に6塩基対の塩基置換を持つ5つのDNA断片を作製した(図6a)。暗条件下および赤色光処理の条件は、実施例6に記載の条件と同じであった。その結果LS2とLS3ので赤色光応答性が見られなくなった(図6b)。特に、LS3では光応答

性が全く見られなくなり、LS3でリンカーが挿入された領域にコア配列が存在することが示された。LS3以外のクローンでは光応答性は認められた。これらの結果は、フィトクロム応答性のシスエレメント中に、12塩基対のコア配列(5'-GGA TTTTACAGT-3')が存在することを示している。この12塩基対のコア配列は、これまでに報告されている光もしくはフィトクロム応答性シスエレメントの中には存在しないことから、フィトクロム応答性シスエレメントの新しいコア配列である

5

10

15

20

25

### 実施例 8. ゲルシフト法による12-bp コア配列に結合する因子の検出

12-bp コア配列に特異的に結合する核内因子が存在するか調べるため、エンド ウ上胚軸核抽出液を用いてゲルシフト・アッセイを行った。核抽出液は暗所生育 (6日間)エンドウと、核を抽出する前に6時間光処理したエンドウ(光処理サ ンプル) からそれぞれ準備した。核抽出液は、石黒らの方法にしたがって調製し た (Ishiguro et al. 1992)。先端から1 cmの茎を細かく切り、250 mlの懸濁緩 衝液(10 mM PIPES-KOH [ pH7.0]、1 M ヘキシレングリコール、10 mM 塩化マグ ネシウム、5 mMβ-メルカプトエタノール、1 mMフェニルメチルスルフォニルフ ロライド (PMSF) 、8  $\mu$ M ペプスタチンA、2.4  $\mu$ Mロイペプチン) 中でホモジナ イズした。ホモジナイズ液をろ過後、核を2,700 x g、15分間の遠心分離により 沈殿させ、50 mlの洗浄緩衝液(50 mM Tris-HCl [pH7.5], 10 mM 塩化マグネシ ウム、20 %グリセロール、5 mMβ-メルカプトエタノール) に懸濁し、5,200 x g 、15分遺心した。この操作を3回繰り返した。沈殿を3 mlの核溶解緩衝液(15 m M PIPES-KOH [pH7.5], 1.25 M 塩化カリウム、5 mM塩化マグネシウム、2.5 mMヂ チオスレオトール、1 mMフェニルメチルスルフォニルフロライド、8 μM ペプス タチンA、2.4 μMロイペプチン) に溶解した。不溶物を5,200 x gで15分間遠心 して除き、さらに100,000 x gで1時間遠心した。上清を透析し、さらに12,000 x gで15分間遠心し、上清を回収して-80℃で保存した。

ゲルシフトアッセイは志水らの方法に依った (Shimizu et al. 1996 Plant Mo 1. Biol. 31: 13-22)。合成プライマーは、-672から-642の31-bp 領域と同じ配 列を持つ合成DNA (WT1) を用い、末端を<sup>32</sup>P-ATPで標識した (図7a)。

WT1 5'-GTCTGAGGATTTTACAGTAATAAAGAAACGA-3'

WT2 5'-TCGTTTCTTTATTACTGTAAAATCCTCAGAC-3'

標識したWT1と合成DNA(WT2)をハイブリダイズした。これに対し、8  $\mu$  g の核抽出液を20 $\mu$ 1の結合緩衝液(20 mM Tris-HC1 [pH8.0]、50 mM塩化カリウム、0.5 mM EDTA、15 mM 塩化マグネシウム、10 %グリセロール、1 mMヂチオスレオトール、2  $\mu$  g poly [dI-dC]-poly[dI-dC])中に加えると、DNAータンパク質複合体が形成したことを示すバンドが検出された(図7b)。光処理したサンプルではこのバンドが明らかに薄いことが示された。このDNAータンパク質複合体のバンドが12-bpコア配列に特異的に結合しタンパク質によるものか調べるため、12-bpコア配列中のアデニンをシトシンに置換した変異DNA(MT1とMT2のハイブリダイズしたもの)を作製した(図7a)。

MT1 5'-GTCTGAGGCTTTTCCCGTAATAAAGAAACGA-3'

MT2 5'-TCGTTTCTTTATTACGGGAAAAGCCTCAGAC-3'

50倍量の非標識DNA(WT1とWT2をハイブリダイズしたもの)の添加によりバンドはほとんど消失したが、50倍、200倍もしくは400倍のコンペティター(MT1とMT2をハイブリダイズしたもの)を加えてもDNAータンパク質複合体が形成したことを示すバンドの濃さはほとんど変わらなかった(図7b)。これらの結果は、検出されたバンドは12-bpコア配列と特異的に結合する核内因子との複合体であることを示している。

20

25

5

10

15

## 実施例 9. 12-bp シスエレメントの光応答性

実施例 5 において、pra2の5'上流領域に存在する12塩基対のコア配列を含む93 塩基対の領域がCaMV 35S90に光応答性を付与するのに十分であることを示した。ここでは、12-bp シスエレメントがCaMV 35Sプロモーターの-46領域からなる最小プロモーター (CaMV 35S46) に光応答性を付与する能力があるかどうかを調べた。CaMV 35S46は-72領域から-90領域に存在するシスエレメントas-1を除いたTATA boxのみを持つプロモーターで、-72領域までのプロモーターをGUS 遺伝子に結合したコンストラクトを持つたタバコではGUS の発現がほとんど認められない。従って、CaMV 35S46に12-bp シスエレメントを結合したプロモーターによっ

て光応答性のGUS の発現が認められれば、12-bp シスエレメント自身が光応答性のプロモーターであることを示している。

まず、CaMV 35S46をPCR によって増幅した。この際のPCR 条件は以下のとおりである。プライマー 35S46UP(5'-AAGCTTGGATCCCTCGAGCTGCAGGATATCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGA-3')とプライマー KZ35SDW(5'-TTCCATGGAAAGCTGCCTAGGAGATCCTCT-3')を用いてpBI221-LUC+ベクターを鋳型にPCR 反応を行い、得られたPCR産物を pZErO-2ベクターにサブクローニングした。得られたクローンからプラスミドを精製した後、制限酵素HindIII 及びNcoIで処理し目的の断片CaMV 35S46を回収した。CaMV 35S46を、HindIII とNcoIで消化したpBI221-LUCベクターに挿入し、35S46-LUC ベクターを得た。ただし、KZ35SDW プライマーを用いることにより、pBI221-LUC+プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子翻訳開始点付近に存在するHindIII 切断部位を除いてあり、元のpBI221ベクターの35S プロモーターとは1塩基異なっている。PCR で増幅させたプロモーター領域については、シーケンシングにより塩基配列を確認した。

5

10

25

15 12-bp シスエレメントの両端に3 塩基対ずつ付加した18塩基対からなる配列を3 つ有するオリゴヌクレオチドWT3 (5'-TGAGGATTTTACAGTAATTGAGGATTTTACAGTA ATTGAGGATTTTACAGTAAT-3')を合成し、5'末端をリン酸化した後、1本鎖のままライゲーションした。その後、WT3 に相補的なWT4 (5'-ATTACTGTAAAATCCTCA ATTACTGTAAAATCCTCA-3')の5'末端をリン酸化した後、上記の1本鎖のままライゲーションしたWT3 とアニールし、pZErO-2 (Invitrogen社)のEcoRV サイトに挿入して、18塩基対からなる配列が9 回繰り返した配列を有するプラスミドを得た。

pZErO-2ベクター由来の配列を除去するために、各々、BamHI サイトとEcoRV サイトを有するプライマー18X9RMDW(5'-GCGATATCCTGGATCCTGAGGATTTT-3')とプライマー18X9RMUP(5'-AGCGGCCGCCAGTGTGGATATCATTACTGT-3')を用い、上記18塩基対からなる配列が9回繰り返した配列を有するプラスミドを鋳型として、PCRを行った。得られた増幅断片をBamHI とEcoRV で消化し、35S46-LUC ベクターのBamHI-EcoRV サイトに挿入して、図9a)に示したpGF9を得た。PCR で増幅させた領域については、シーケンシングにより配列を確認した。次に、pGF9の12-bp シ

スエレメント中の3 つのアデニンをシトシンに置換したプラスミドpGF9M を、上記と同様の方法で、プライマーMT3 (5'-TGAGGCTTTTCCCGTAATTGAGGCTTTTCCCGTAATTGAGGCTTTTCCCGTAATTGAGGCTTTTCCCGTAATTGAGGCTTTTCCCGTAATTACGGGAAAAGCCTCAATTACGGGAAAAGCCTCAATTACGGGAAAAGCCTCA-3')を用いて構築した。

プラスミドpGF9を、実施例 2 に示した方法でパーティクルガンによりエンドウ上胚軸に導入した。プラスミド導入後、さまざまな条件で光照射し、暗所に12時間インキュベートした際のレポーター酵素の活性を測定した(図 8 b)。光照射せずに暗所に12時間インキュベートした際のレポーター酵素の活性を1 0 0 %とした場合、2 分間の赤色光照射によって約 6 0 %の活性しか示さず、レポーター遺伝子の発現が抑制されることがわかった。2 分間の赤色光照射の後に5 分間の近赤外光を照射すると赤色光による抑制効果は打ち消され、5 分間の近赤外光の照射のみの場合と同様、暗所に12時間インキュベートしたコントロールの約80%の活性を示した。プラスミドpGF9Mを同様にエンドウ上胚軸に導入し、暗所と光に対する応答を調べたところ、暗所での強い発現は認められず、赤色光と赤色光/近赤外光による可逆的な制御も認められなかった(図 8 b)。以上の結果は、12-bpシスエレメントが暗所での強い発現およびフィトクロムを介した光応答発現の制御に関わっていることを示している。それと同時に、12-bpシスエレメントはそれ自身で最小プロモーター(CaMV 35S46)に光応答性を付与するのに十分であることも示している。

20

25

15

5

10

#### 発明の効果

以上述べてきたように、本発明によって光抑制性のプロモーター配列、該プロモーター中に存在する93塩基対からなる光抑制性のシスエレメントの配列、及び該シスエレメント中に存在する12塩基対からなるコア配列が開示され、これらの塩基配列を有するDNA断片を用いて、植物細胞もしくは植物体において目的遺伝子を光抑制的に、ないしは暗所で特異的に、発現させることができる。

5

#### 請求の範囲

- 1. 配列番号1に記載の配列をコア配列として含むDNA断片であって、当該DNA断片の下流に設置される遺伝子の発現を光の存在下で抑制することを特徴とするDNA断片。
- 2. 配列番号 2 に記載の配列、あるいは当該配列中で配列番号 1 に記載のコア 配列以外の部分において 1 個若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び/又は付加 された塩基配列を含むDNA断片であって、その下流に設置される遺伝子の発現を 光の存在下で抑制するシスエレメントである、請求項 1 に記載のDNA断片。
- 10 3. 配列番号 3 に記載の塩基配列からなる請求項 1 に記載のDNA断片。
  - 4. 配列番号1に記載の塩基配列をコア配列として含むプロモーターであって、当該プロモーターの下流に設置される遺伝子の発現を暗所で促進するが、光の存在下で抑制することを特徴とするプロモーター。
- 5. 配列番号 2 に記載の配列、あるいは当該配列中で配列番号 1 に記載のコア 15 配列以外の部分において 1 個若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び/又は付加 された塩基配列を含む請求項 4 に記載のプロモーター。
  - 6. 配列番号3に記載の塩基配列からなる請求項4に記載のプロモーター。
  - 7. 構成的に発現するプロモーター配列を下流に結合した、請求項1ないし3のいずれか1項に記載のDNA断片。
- 20 8. 構成的に発現するプロモーターを下流に結合した、請求項4ないし6のいずれか1項に記載のプロモーター。
  - 9. 構成的に発現するプロモーターがカリフラワーモザイクウィルス由来の35 Sプロモーターである請求項7に記載のDNA断片。
- 10. 構成的に発現するプロモーターがカリフラワーモザイクウィルス由来の 25 35Sプロモーターである請求項8に記載のプロモーター。
  - 11. 請求項1ないし10のいずれかに記載のDNA断片もしくはプロモーターの下流に遺伝子を結合したDNA断片からなり、該遺伝子の発現が光によって抑制されることを特徴とする発現カセット。
    - 12. 請求項11に記載の発現カセットまたは該カセットを含むDNA断片で形

WO 00/55313

PCT/JP00/01269

質転換された植物細胞。

13. 請求項11に記載のDNA断片で形質転換された植物またはその子孫、および該植物またはその子孫の植物体の一部。

5

10

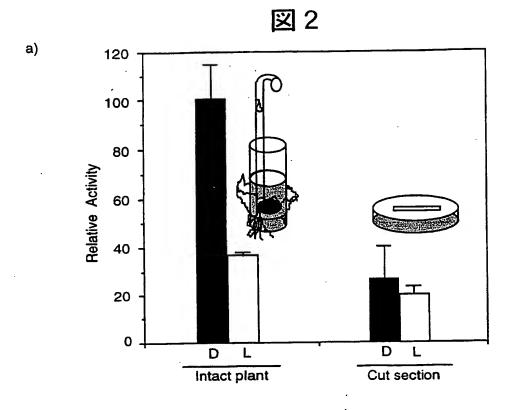
15

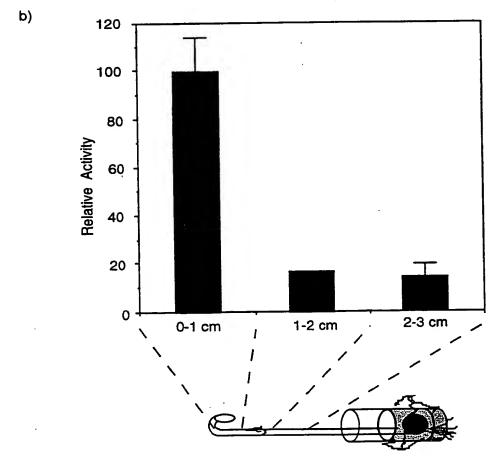
20

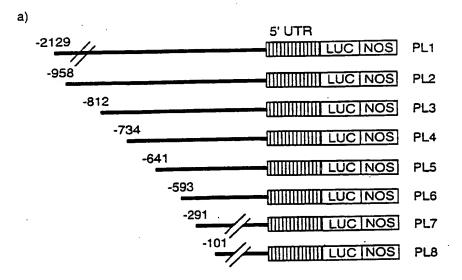
25

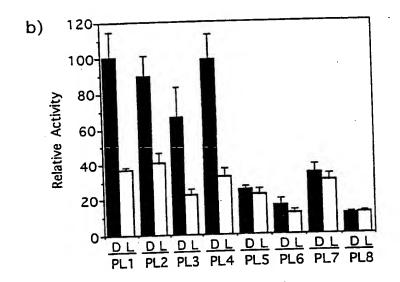
AAGCTTTAAAGGCAAGGGAAAGACAACAATTCCAAAAAATATAAAAACTCCTAAAGAATGATTTTATTCTTATCTTCATAAATAA	-2040
${\tt CTATTCCAAAAACACATCAAAGTTATGTGATTCATATCTTTAATTATCTGATAATATATAT$	-1950
TTATATGAAATATTTTGTAGGTAAAAGGGACTAAGAATAACCTCCGCAACATCAAAGTCAGAAACCTCTTGTAACTCTTCAGTTGAAACG	-1860
A GAAG GAAG TGGACAACACAGAAAACTAAG TTCCCCCACTTAACTTCTTGGTTTGGGTGAGGACTTCCTTTACAATTTATACTCTAAGGAAGAAGGAAG	-1770
AATACATTAGACACTCTAGATGGGTTGCATTAGCTCATATTTTTTAAGTAATAACCCACTTCAAGTTTTTTTGTTTG	-1680
CAGTAGATGATAAGATGGATCATTTCTCAAGGCCCTTATGCAAAGACATAAGATCCATATACTCCACCAAGATTGCTTTACATCTAACCA	-1590
AGTTAATGAATTTAAATTCTTCGAAACAATTATTTCCTACCAAAGGAAGTTTATATGCACATTTTCTAATGTATTTTTATATAGAATTGA	-1500
TACATGTTTCTGTTATACAAGATTAGAATTTGGATTTCTCATCCAAACTCCTACACTTGGTGAGAAATTTCAGCCTCAACCTCAGTAAAT	-1410
${\tt CAGGTTCCTCCAAACTCATACACTTGGTTGAGTGAGAATTATGGACGTCAACCTAGCAATATGAATCCCTCTCCAAGATCCTACACTACACTACACTACACTACAACTCACACTACAACTACAACTCAAACTCAAACTCAAACTCAAACTCAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAACTCAAAAACTCAAAAACTCAAAAACTCAAAAACTCAAAAACTCAAAAAA$	-1320
TATCTGAGTGAGAATTTTGGTCCTCGACCTCAACAAGATAGAT	-1230
${\tt ACC} {\tt CAAACAAGTGAGAGAGACATCACATATCAACCAAAACCTTAAGGTGATAGGTGTATGAGTTCTCTTACTTA$	-1140
<u>CACTTTTCTAAGCAATGTGTGACTTAGA</u> ACTCACACTTATTTCTCAACATAACTCACACTTGTTTTATCAACAAATCTCCCCCACAAGTGTG	
AGTTCATTCGCTATGTCCCCCTCAAGTGGAATCTCTTTCATCCGCATGCTTATACCGTTGTTGACATACAT	<del>-9</del> 60
TTCAATGGGACACGCTGCCTGACCACCATGTCAAGAAGACTTTTGACACAAGGAGTCGGTCCCTTACTCGAACCAGACTCTGATACCATT	-870
AATAGATCACTTTGAATGGATATCATTCATACTATATCAAACATTTACGTAAAGATAAAAAATTCACCCAAACAAA	780
CATCTCTCTTATTATTAATAAAATGTAAAAAATATAGTATTAAAAAGTAACACATATTTTGATAAATTTATTACTAAAACTATTTTC	-690
12bp element TAGTACTTGTTAATCATGTCTGAGGATTFFACAGTAATAAAGAAACGAGGTAGCCCAAACAAAAGTGATAATTGTGGAGGGTGTGATCTT	
TGTCGGTGCAAAAAATGAACCCCAAACTTGTGATATTGTGTCGACTGCTCCGTCGCTACATTGAAATTAATGAATG	-600
	-510
TTTGTCTATGCCGTATTACCCATATGGTCACTAGAATGGGACAATGAATTTAATATATAT	-420
ACATTGCTAAAGAAAATTACCACCTTAAAATGTTTATCCCTTGCACACATTTCACCACTCAATTATTAAAAACATTTTACCATTGGAAAACA	-330
CATACATATCAATCAATCAATTATTTTTGCAATTTCAAAAACTTAAACCAAACTTAGAATATTTTGTAATTATAGCACAATTTTCAAAAA	-240 -150
TATCCTAGTCTTCAACCACTCAATAATTCACAATTTCCAAATCCCTTGCAAAACATCACAACCTCTAGAAACTTTGATTAATAATCTAAT	-60
TATA box V transcriptional start site	-60
AAAAGCAATAATATGATATCTAAACAATATCACCATATATGTTATGATATAATATGATGCAGCAATACACTTAATTTGGTAAAGCATTAA	31
AGCGAGACAACTCTATTAACACCGGTAATTCAACAACCGTTGTTGTCGAGTTCATGTTTTCTTCCCAACTCTTTTCCTTTACTTT	121
ATTTATTTCTCCTACTTACCTTTTCTACTAATATATACTATCTCTCTTGAACCTCTTTTTGATCTTGACAAGAAAATGAACCAAGAAAATG	211
M N Q E M	
AATGBAGTAGAAGCTGAAAAGCTTCAAGAAAAAATAGATTATGTGTTTAAGGTTGTCGTGATTGGTGATTCTGCAGTAGGAAAAACTCAA	301
NGVEAEKLQEKIDYVFKVVVIGDSAVGKTQ	
ATATTGTCGAGGTTTACAAAGAATGAGTTCTGTTYTGACTCAAAATCAACCATTGGTGTTGAGTTTCAAACTAAAACTGTCACTATTAAT	391
IL S R F T K N E F C F D S K S T I G V E F Q T K T V T I N	
▼ GGTAAACTCATCAAAGCTCAGAATCTGGGATACTGCTGGCCAAGAAAGGTTTCTTTC	
G K L I K A Q I W D T A G Q E R	481
TACATTGTGTGGGAATAACATCTGCATCTGCATCTGAATCTCTGCAACACCCGACATCTCTAAAAAAAA	571
<b>V</b>	317
TGATTATGTCTGATTTATTATTTTTCAGGTATAGAGCGGTGACAAGTGCATACTATAGAGGAGCATTAGGGGCCCATGCTAGTCTACGACA	661
YRAVTSAYYRGALGAMLVYD	I
TAACTAAAAGACAAACATTTGATCATGTTGCTAGATGGGTTGAGGAACTGAGATCACACGCTGACGGTTCGATCGTCATCATGTTAATTG	751
T K R Q T F D H V A R W V E E L R S H A D G S I V I M L I	G
GTAACAAAGGTGATCTTGTGGACCAAAGAGGTGTACAGACTGAAGATGCGGTTGAGTTTGCAGAGGATCAGGGTCTCTTTTTCTCAGAAA	841
N K G D L V D Q R G V Q T E D A V E F A E D Q G L F F S E	T
CTTCTGCTTTTAGTGGTGAAAATGTGAACTCTGCTTTTCTCAAGTTGCTTCAAGAGGATTAATAAGGTTGTTTCTAAAAGGTCTTTGGAAT	931
S A E S C F N V N F A F A W A A C C F N N N N N	C 331
GTAATAATGGGATTAAGGGAAATGGTAATCATGATGTTGCAGCACTTAAAGGGGAGAAAATTGATATAATTTCAGCTTCTGAATTGGAAA	-
N N G I K G N G N H D V A A L K G E K I D I I S A S E L E	1021 I
TTAGTGAAATCAAGAAATTGCATTCATGTTCTTGTTGATCTAAACAAGAGTCAAAAGTATATTACAAAAAAAA	_
S E I K K L H S C S C	****
TCAGAATTGAAGAGCTTTTACTTATTTTGTTTCTGTTTGGGTGAATTACAGTAATGATTTTTACATTTTTTTT	1701
CCTTGTATCTTTTATTTTAAGATTTTATATTGAGGTTAAATTGTTTGT	1201 1291
	<b>キ</b> ムフォ
GATATCGAATTCCTGCAGCCC	1312

THIS PAGE BLANK (USPTO)









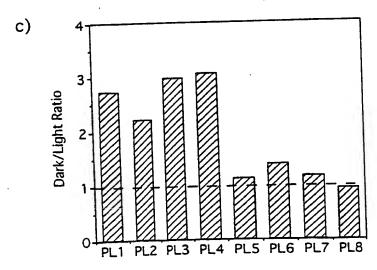
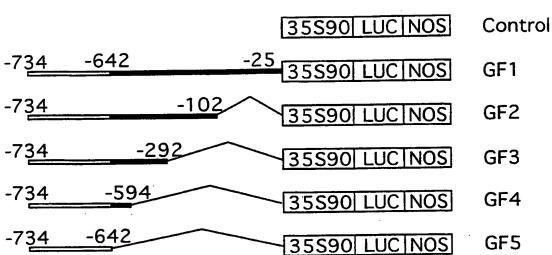


図 4

a)



b)

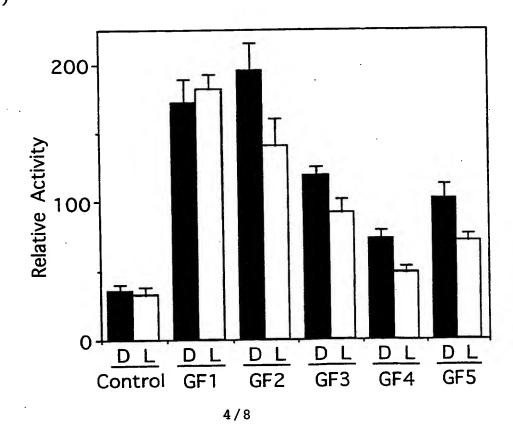
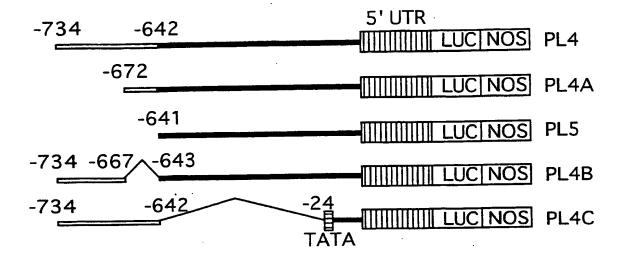
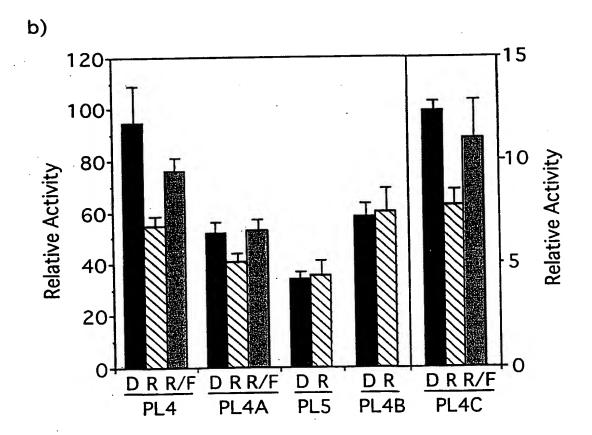


図 5

a)





-672 12bpelement -642
GTCTGAGGATTTTACAGTAATAAAGAAACGA WT
cTgcagGGATTTTACAGTAATAAAGAAACGA LS1
GTCTGACtgcagTACAGTAATAAAGAAACGA LS2
GTCTGAGGATTTCtgcagAATAAAGAAACGA LS3
GTCTGAGGATTTTACAGTCtgcAgGAAACGA LS4
GTCTGAGGATTTTACAGTAATAAACtgcaGA LS5

b)



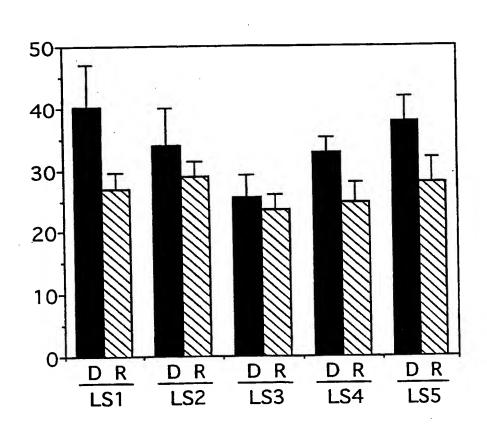


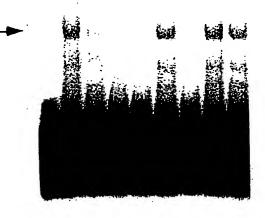
図 7

a)

Competitor WT MT

(fold) - - 50 50 50 50 200 400

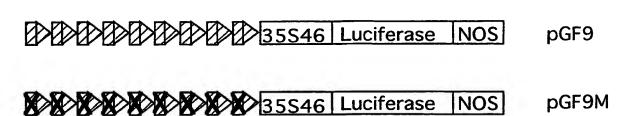
Nuclear
Extract



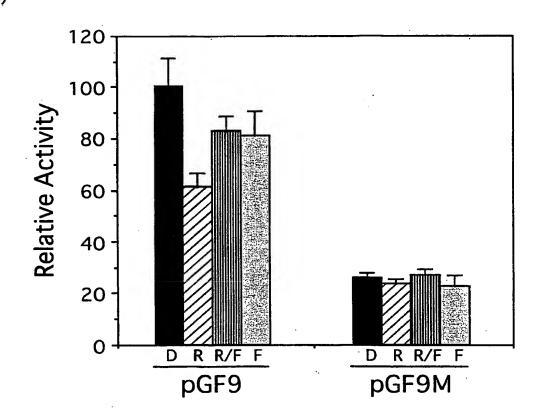
Lane No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9

図 8

a)



b)



<211> 2325

## SEQUENCE LISTING

<110>	SUNTORY LIMITED	
<120>	Light Repressible Promoter	
<130>	YCT-483	
<150>	JP Hei 11-66551	
<151>	1999-3-12	
<160>	40	
<210>	1	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	Pisum sativum cv. Alaska	
<223>	Nucleotide sequence for a core region of light repressible	
	promoter from the pea small GTPase gene	
<400>	1	
ggatti	ttaca gt	12
<210>	2	
<211>	93	
<212>	DNA	
<213>	Pisum sativum cv. Alaska	
<223>	Nucleotide sequence for a cis element of light repressible	
	promoter from the pea small GTPase gene	
<400>	2	
aaaag	taaca catattttga taaatttatt actaaaacta ttttctagta cttgttaatc	60
atgtc	tgagg attttacagt aataaagaaa cga	93
<210>	3	

<212> DNA

<213> pisum sativum cv. Alaska

<223> Nucleotide sequence for a light repressible promoter from the pea small GTPase gene

<400> 3

60 aagctttaaa ggcaagggaa agacaacaat tccaaaaaata taaaaactcc taaagaatga 120 ttttattctt atcttcataa ataacttttc ctattccaaa aacacatcaa agttatgtga ttcatatctt taattatctg ataatatata attgtatatt caatatttca tacaattgtg 180 ttatatgaaa tattttgtag gtaaaaggga ctaagaataa cctccgcaac atcaaagtca 240 gaaacctctt gtaactcttc agttgaaacg agaaggaagt ggacaacaca gaaaactaag 300 ttcccccact taacttcttg gtttgggtga ggacttcctt tacaatttat actctaagga 360 aatacattag acactctaga tgggttgcat tagctcatat atttttaagt aataataccc 420 acttcaagtt ttttgttttt tgttgttgtg cagtagatga taagatggat catttctcaa 480 ggcccttatg caaagacata agatccatat actccaccaa gattgcttta catctaacca 540 600 agttaatgaa tttaaattct tcgaaacaat tatttcctac caaaggaagt ttatatgcac attttctaat gtattttat atagaattga tacatgtttc tgttatacaa gattagaatt 660 tggatttctc atccaaactc ctacacttgg tgagaaattt cagcctcaac ctcagtaaat 720 caggttcctc cttcaaactc atacacttgg ttgagtgaga attatggacg tcaacctagc 780 aatatgaatc cctctccaag atcctacact tatctgagtg agaattttgg tcctcgacct 840 caacaagata gatttgatgg gtcatcacga ggggaagcat tcacattggg tcaaagattc 900 acccaaacaa gtgagagaga catcacatat caaccaaaac cttaaggtga taggtgtatg 960 agttetetta ettataaagt geteaacete eaettteta ageaatgtgt gaettagaac 1020 tcacacttat ttctcaacat aactcacact tgtttatcaa caatctcccc cacaagtgtg 1080 agttcattcg ctatgtcccc ctcaagtgga atctctttca tccgcatgct tataccgttg 1140 ttgacataca tctttactcg tcatgggcac ttcaatggga cacgctgcct gaccaccatg 1200 tcaagaagac ttttgacaca aggagtcggt cccttactcg aaccagactc tgataccatt 1260 aatagatcac tttgaatgga tatcattcat actatatcaa acatttacgt aaagataaaa 1320 aattcaccca aacaaatgag agagacacta catctctctt attatattaa taaaatgtaa 1380 agaaaaatat agtataaaag taacacatat tttgataaat ttattactaa aactattttc 1440

tagtacttgt taatcatgtc tgaggatttt acagtaataa agaaacgagg tagcccaaac 1500 aaaagtgata attgtggagg gtgtgatctt tgtcggtgca aaaaatgaaa ccccaaactt 1560 gtgatattgt gtcgactgct ccgtcgctac attgaaatta atgaatgttc ttttataacg 1620 tttgtctatg ccgtattacc catatggtca ctagaatggg acaatgaatt taatatatat 1680 ctgtcatgtg tgggtggatt caatttaatt gtatcgtaaa tggtaggaca tactcatgct 1740 acacaattat atcatcactg gtcaatcact ggtcaatgtg ttttctcttc ccatgaattc 1800 acattgctaa agaaaattac caccttaaaa tgtttatccc ttgcacacat ttcacatcaa 1860 tttattaaaa cattttacca ttggaaaaca catacatatt caatcaatta tttttgcatt 1920 ttcaaaaact aaaccaaaca aacttagaat attttgtaat tatagcacaa ttttcaaaaa 1980 tatcctagtc ttcaaccact caataattca caatttccaa atcccttgca aaacatcaca 2040 acctctagaa actttgatta ataatctaat aaaagcaata atatgatatc taaacaatat 2100 caccatatat gttatgatat aatatgatgc agcaatacac ttaatttggt aaagcattaa 2160 agcgagacaa ctctattaac accggtaatt caacaaccgt tgttgtcgag ttcatgtttt 2220 cttccaactc ttttcctttt cctttacttt atttattct cctacttacc ttttctacta 2280 2325 atatatacta tctctcttga acctcttttt gatcttgaca agaaa

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Primer used in Example 1

<400> 4

acggttgttg aattaccggt gttaatagag

30

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> NcoI primer used in Example 3

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
<400> 5	
ggtccatggt cttgtcaaga tc	22
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL1 in Example 3	
<400> 6	
gggaagcttt aaaggcaagg g	21
	•
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL3 in Example 3	
<400> 7	
acgtaaagct taaaaattca ccc	23
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL4 in Example 3	
<400> 8	
aaataaagct taaaagtaac acata	25
<210> 9	
<211> 27	

WO 00/55313 <212> DNA	PCT/JP00/01269
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL4B in Example 3	
<400> 9	27
gtactgcagt cagacatgat taacaag	21
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL5 in Example 3	
<400> 10	
aaagaagctt ggtagcccaa acaa	24
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing LS1 in Example 3	
<400> 11	
aagcttctgc agggatttta cagtaataaa	30
<210> 12	
<211> 35	
<212> DNA	·
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing LS2 in Example 3	
<400> 12	
aagcttgtct gactgcagta cagtaataaa gaaac	

<210> 13	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing LS3 in Example 3	
<400> 13	
aagcttgtct gaggatttct gcagaataaa gaaacgaggt ag	42
<210> 14	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing LS4 in Example 3	
<400> 14	10
aagcttgtct gaggatttta cagtctgcag gaaacgaggt agcccaaa	48
<210> 15	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing LS5 in Example 3	
<400> 15	FC
aagcttgtct gaggatttta cagtaataaa ctgcagaggt agcccaaaca ag	52
<210> 16	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
<223> Primer used for preparing PL2 in Example 3	
<400> 16	22
tcaatgggac acgctgcctg accaccatgt	30
<210> 17	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> pUC19 primer used in Example 3	
<400> 17	01
ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt g	31
<210> -18	
<210>-18 <211>-30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL6 in Example 3	
<400> 18	
tgtcggtgca aaaaatgaaa ccccaaactt	30
<b>18.008.000 annua squan coc</b> ommer.	
<210> 19	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL7 in Example 3	
<400> 19	
aatgtttatc ccttgcacac atttcacatc	30
<210> 20	

THIS PAGE BLANK

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL8 in Example 3	
<400> 20	
gcaaaacatc acaacctcta gaaac	25
<210> 21	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL4c in Example 3	
<400> 21	
gtttggctgc agtcgtttct ttattactgt aaaatcctc	39
<210> 22	
<211> 39	
<212> DŅA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing PL4C in Example 3	
<400> 22	
caatactgca gtatatgtta tgatataata tgatgcagc	39
<210> 23	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> gF primer used for preparing gF1 in Example 3	
<400> 23	

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
tactgcagaa aagtaacaca tattt	25
<210> 24	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing gF1 in Example 3	
<400> 24	
tggtgatatt gtttagatat catattattg c	31
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing GF2 in Example 3	
<400> 25	
atgatatcca agggatttgg aaat	24
<210> 26	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing GF3 in Example 3	
<400> 26	
gtgatatcgg gataaacatt ttaagg	26
<210> 27	
<211> 24	
<212> DNA	

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing GF4 in Example 3	
<400> 27	
ttgatatccc gacaaagatc acac	24
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer used for preparing gF5 in Example 3	
<400> 28	
gggatatete gtttetttat taet	24
<210> 29	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Synthetic DNA WT1 used in Example 8	
<400> 29	
gtctgaggat tttacagtaa taaagaaacg a	31
<210> 30	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Synthetic DNA WT2 used in Example 8	
<400> 30	
tcgtttcttt attactgtaa aatcctcaga c	31

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
<210> 31	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Synthetic DNA MT1 used in Example 8	
<400> 31	
gtctgaggct tttcccgtaa taaagaaacg a	31
<210> 32	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Synthetic DNA MT2 used in Example 8	
<400> 32	
tcgtttcttt attacgggaa aagcctcaga c	31
<210> 33	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer 35S46UP used in Example 9	
<400> 33	
aagettggat eectegaget geaggatate geaagaceet teetetatat	aagga 55
<210> 34	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer KZ35SDW used in Example 9	

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
<400> 34	
ttccatggaa agctgcctag gagatcctct	30
<210> 35	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Origonucleotide WT3 used in Example 9	
<400> 35	
tgaggatttt acagtaattg aggattttac agtaattgag gattttacag ta	at 54
<210> 36	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Origonucleotide WT4 used in Example 9	
<400> 36	
attactgtaa aatcctcaat tactgtaaaa tcctcaatta ctgtaaaatc tc	a 53
<210> 37	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer 18X9RMDW used in Example 9	
<400> 37	
gcgatatcct ggatcctgag gatttt	26
<210> 38	
<211>	

WO 00/55313	PCT/JP00/01269
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer 18X9RMUP used in Example 9	
<400> 38	
agcggccgcc agtgtggata tcattactgt	30
<210> 39	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer MT3 used in Example 9	
<400> 39	
tgaggctttt cccgtaattg aggcttttcc cgtaattgag gcttttcc	cg taat 54
<210> 40	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Primer MT4 used in Example 9	
<400> 40	
attacgggaa aagcctcaat tacgggaaaa gcctcaatta cgggaaaa	gc ctca 54

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01269

A. CLASS Int.	IFICATION OF SUBJECT MATTER C1 <sup>2</sup> C12N15/11, 5/14, A01H5/00		
	International Patent Classification (IPC) or to both nati	ional classification and IPC	
	SEARCHED		
Int.	cumentation searched (classification system followed b Cl <sup>7</sup> Cl2N15/00-15/90		
	on searched other than minimum documentation to the		
GENB	ata base consulted during the international search (name ANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ INE/BIOSIS/WPI (STN)	of data base and, where practicable, sear	ch terms used)
C. DOCUI	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where app	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Plant physiol.,120,June 1999  Takehito Inaba et al., "Identification of a cis-regulatory element involved in Phytochrome down-regulated expression of the pea small GTPase gen pra2",p.491-499		1-13
Y	Plant Cell Physiol., 39(Supplement),1998  Takehito Inaba et al., "Analysis of cis-elements needed for light-repressed expression of pra2 gene", p.s66		1-13
Y	Plant Cell Physiol.,34(3),Apr.1993 Yukio Nagano et al., "Isolation and characterization of cDNAs that encodes eleven small GTP-binding proteins from Pisum sativum", p.447-455		1-13
Y	The EMBO Journal, 16(10), May 1997 Gunther Neuhaus et al., "Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP", p. 255-2564		1-13
Y	The EMBO Journal, 10(10), Oct. 1991 Wesley B.Bruce et al., "A negatively acting DNA sequence		1-13
Furthe	r documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:  "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  "E" earlier document but published on or after the international filing date  "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  "P" document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family		ne application but cited to carlying the invention cannot be claimed invention cannot be red to involve an inventive claimed invention cannot be p when the document is a document, such a skilled in the art family	
	actual completion of the international search Aay, 2000 (26.05.00)	Date of mailing of the international sea 06 June, 2000 (06.0	
	nailing address of the ISA/ anese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile N	io.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01269

-		·	
C (Continua	tion). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the releva	Relevant to claim No.	
	element mediates phytochrome-directed repress gene transcription",p.3015-3024	ion of phyA	
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90(14), July 1993 Kazuichi Yoshida et al., "Phytochrome expression of the genes encoding the small G proteins in peas", p.6636-6640		1-13
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92(14), July 1995 YukioNaganoetal., "Location of light-repressi GTP-binding protein of the YPT/rab family in t zone of etiolated pea stems",p.6314-6318		1-13
A	Plant Physiol., 116, 1998 Sharlene C.Weatherwax et al., "The phytochrom of the Lemma gibba NPR1 Gene is mediated primari changes in abscisic acid levels",p.1299-1305	ly through	1-13
	·		
-			
			·
:			

### 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01269

A. 発明の	<b>属する分野の分類(国際特許分類(IPC))</b>		
Int.	. C1' C12N15/11, 5/14, A0	1H5/00	
D 鋼木丸	行った八郎		
	行った分野 最小限資料(国際特許分類(IPC))		
Int	. Cl' C12N15/00-15/90		
最小限資料以外	外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
		•	
国際調査で使用		御本に体用した田等)	
	NBANK/EMBL/DDBJ/GENESI DLINE/BIOSIS/WPI (STN)	E Q	
C. 関連する 引用文献の	ると認められる文献 		88 本 子
カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連する。	ときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	_		
Р, Х	Plant physiol., 120, June 1999		1-13
	Takehito Inaba et al., "Identifica	ation of a cis-regulatory	
	element involved in Phytochrome of	down-regulated expression	
	of the pea small GTPase gen pra2°	, p. 491–499	
Y	  Plant Cell Physiol.,39(Supplement	-) 1009	1-13
1	Takehito Inaba et al., "Analysis o		1-15
	light-repressed expression of pra		
	G	- Bene , p. 200	
▼ C欄の続き	さにも文献が列挙されている。 	パテントファミリーに関する別	紙を参照。
* 引用文献の		の日の後に公表された文献	
IA」特に関連 もの	<b>車のある文献ではなく、一般的技術水準を示す</b>	「T」国際出願日又は優先日後に公表さ て出願と矛盾するものではなく、	
-	<b>頂日前の出願または特許であるが、国際出願日</b>	論の理解のために引用するものにはなく、	先明の原在人は座
以後にな	☆表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当	
	E張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 、は他の特別な理由を確立するために引用する	の新規性又は進歩性がないと考え	
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以 文献(理由を付す) 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに			
「〇」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 よって進歩性がないと考えられるもの			
□P」国際出象	百日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了	了した日 26.05.00	国際調査報告の発送日 06.06	5.00
国際調査機関の		特許庁審査官(権限のある職員)	4B 9838
	SAM C C C S A / J P )	鈴木恵理子	
	事便番号100-8915	e de la companya de l	
東京都	東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

### 国際調査報告

# 国際出願番号 PCT/JP00/01269

<u>C(続き).</u> 引用文献の	関連すると認められる文献	田油ナイ
カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Plant Cell Physiol., 34(3), Apr. 1993 Yukio Nagano et al., "Isolation and characterization of cDNAs that encodes eleven small GTP-binding proteins from Pisum sativum", p. 447-455	1-13
Y	The EMBO Journal, 16(10), May 1997 Gunther Neuhaus et al., "Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP", p. 2554-2564	1–13
Y .	The EMBO Journal, 10(10), Oct. 1991 Wesley B. Bruce et al., "A negatively acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of phyA gene transcription", p. 3015-3024	1–13
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(14), July 1993 Kazuichi Yoshida et al., "Phytochrome-regulated expression of the genes encoding the small GTP-binding proteins in peas", p. 6636-6640	1-13
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(14), July 1995 Yukio Nagano et al., "Location of light-repressible, small GTP-binding protein of the YPT/rab family in the growing zone of etiolated pea stems", p. 6314-6318	1-13
A	Plant Physiol., 116, 1998 Sharlene C. Weatherwax et al., "The phytochrome response of the Lemma gibba NPR1 Gene is mediated primarily through changes in abscisic acid levels", p. 1299-1305	1-13



# PATENT COOPERATION TREATY

#### **PCT**

## NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio MA 15 2000 Yuasa and Hara MA 15 2000 New Ohtemachi Building (Section 20 2-1, Ohtemachi 2-shome (N 15)

Chiyoda-ku Tokyo 100-0004

JAPON

Date of mailing (day/month/year) 03 May 2000 (03.05.00)	
Applicant's or agent's file reference YCT-483	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/01269	International filing date (day/month/year) 03 March 2000 (03.03.00)
International publication date (day/month/year)  Not yet published	Priority date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)

Applicant

## SUNTORY LIMITED et al

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the
  International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise
  indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority
  document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- 2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- 3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- 4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date Priority application No.

Country or regional Office or PCT receiving Office

Date of receipt of priority document

12 Marc 1999 (12.03.99)

11/66551

JP

25 Apri 2000 (25.04.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Authorized officer

Tessadel PAMPLIEGA tap

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (HERTA)

0 0-1	For receiving Office use only		
0-1	International Application No.		
0-2	International Filing Date	A 10	
		3/3/00	
0-3	Name of receiving Office and "PCT		
	International Application"	$\phi = -i \lambda_{ij} \cdot \lambda_{ij}$	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request		
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90	
		(updated 15.12.1999)	
0-5	Petition	(4544664 13:12:133))	
	The undersigned requests that the		
	present international application be processed according to the Patent	·	
	Cooperation Treaty		
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japanese Patent Office (RO/JP)	
0-7	Applicant's or agent's file reference	YCT-483	
1	Title of invention	LIGHT-REPRESSIBLE PROMOTERS	
11	Applicant		
II-1	This person is:	applicant only	
II-2	Applicant for	all designated States except US	
II-4	Name	SUNTORY LIMITED	
II-5	Address:	1-40, Dojimahama 2-chome,	
		Kita-ku,	
		Osaka-shi, Osaka 530-8203	
	· ·	Japan	
11-6	State of nationality	JP	
II-7	State of residence	JP	
III-1	Applicant and/or inventor		
lil-1-1	This person is:	applicant and inventor	
III-1-2	Applicant for	US only	
III-1-4	Name (LAST, First)	SASAKI, Yukiko	
III-1-5	Address:	1-14-A301,	
		Mitsuke-cho, Chikusa-ku,	
		Nagoya-shi, Aichi 464-0817	
		Japan	
III-1-6	State of nationality	JP	
III-1-7	State of residence	JP	

	I American American	
<b>III-2</b> III-2-1	Applicant and/or inventor This person is:	
III-2-2	Applicant for	applicant and inventor
111-2-2	Name (LAST, First)	US only
_	<u>'</u>	NAGANO, Yukio
III-2-5	Address:	2-913-2F,
		Yomogidai, Meitou-ku,
		Nagoya-shi, Aichi 465-0091
	Oberto of a citizen city	Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
<b>III-3</b> III-3-1	Applicant and/or inventor This person is:	
III-3-2	Applicant for	applicant and inventor
III-3-2 III-3-4	··	US only
	Name (LAST, First)	INABA, Takehito
III-3-5	Address:	1-92-201,
		Kawanayama-cho, Showa-ku,
		Nagoya-shi, Aichi 466-0827
		Japan
III-3-6	State of nationality	JP
III-3-7	State of residence	JP
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is	agent
	hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the	
	competent International Authorities as:	
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	Section 206, New Ohtemachi Bldg.,
		2-1, Ohtemachi 2-chome,
		Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004
		Japan
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as
		first named agent
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KURITA,
		Tadahiko; KOBAYASHI, Yasushi; MURAKAMI,
		Kiyoshi
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR
	(other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses	IE IT LU MC NL PT SE and any other
	after the designation(s) concerned)	State which is a Contracting State of
		the European Patent Convention and of
		the PCT
V-2	National Patent	AU CA JP NZ US
	(other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses	
	after the designation(s) concerned)	

THIS PAGE BLANK (UDETC)

YCT-483

<del></del>	The state of the s	<u> </u>	
V-5	Precautionary Designation Statement		
	In addition to the designations made		,
	under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b)		
	all designations which would be		
	permitted under the PCT except any		
	designation(s) of the State(s) indicated		
	under item V-6 below. The applicant		
	declares that those additional		
	designations are subject to confirmation		
	and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15		
	months from the priority date is to be		
	regarded as withdrawn by the applicant		
	at the expiration of that time limit.		<u>.</u>
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national		
•••	application		
VI-1-1	Filing date	12 March 1999 (12.03	1000
VI-1-2	Number	66551/1999	1999 )
VI-1-3	Country	JP	
VI-2	Priority document request		
	The receiving Office is requested to	VI-1	·
	prepare and transmit to the International		
	Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as		
	item(s):		•
VII-1	International Searching Authority	Japanese Patent Offi	Ce (IDO) (TCA/ID)
	Chosen	capanese racent offi	ce (UFO) (ISA/UF)
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	5	-
VIII-2	Description (excluding sequence listing part)	20	-
VIII-3	Claims	2	-
VIII-4	Abstract	1	-
VIII-5	Drawings	8	-
VIII-6	Sequence listing part of description	13	_
VIII-7	TOTAL	49	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	<b>-</b>	-
VIII-9	Separate signed power of attorney		-
VIII-15	Nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		separate diskette
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the international application	Japanese	
IX-1	Signature of applicant or agent		
IX-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio (sea]	1
		DIFFIGURE (SCC)	- ,

Date of receipt of the record copy by the international Bureau

11-1

IX-2	Signature of applicant or agent	
IX-2-1	Name (LAST, First)	IMAI, Shosuke (seal)
IX-3	Signature of applicant or agent	
IX-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)
IX-4	Signature of applicant or agent	
IX-4-1	Name (LAST, First)	KURITA, Tadahiko (seal)
IX-5	Signature of applicant or agent	·
IX-5-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi(seal)
IX-6	Signature of applicant or agent	
IX-6-1	Name (LAST, First)	MURAKAMI, Kiyoshi (seal)
	FOR	RECEIVING OFFICE USE ONLY
10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	